

**PRIORITY
DOCUMENT**

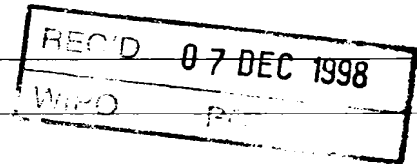
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EPO - DG 1

25. 11. 1998

Bescheinigung



Herr Professor Dr. med. Dr. h.c. Wolf-Georg F o r s s m a n n
in Hannover/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Be-
zeichnung

"Cadherin derived growth factor und seine Ver-
wendung"

am 25. März 1998 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 07 H, C 07 K und C 12 N der Internationalen Patent-
klassifikation erhalten.

München, den 26. Oktober 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Joost

Aktenzeichen: 198 13 088.0

Cadherin Derived Growth Factor und seine Verwendung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide (Eiweißstoffe) mit zellproliferativen, zelldifferenzierenden und/oder zellprotektiven Eigenschaften, die als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnet werden sowie ihre Verwendung.

Aufgabe der Erfindung ist es, Peptide bereitzustellen, die zellproliferativen, zellprotektiven und/oder zelldifferenzierenden Eigenschaften aufweisen.

Gelöst wird die Aufgabe durch als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnete Peptide, deren Sequenz einer Teilsequenz eines Prä-Pro-Cadherins entspricht, wobei das Präpro-Cadherin die Domänen Signalsequenz, Pro-Sequenz, Cadherin repeats, Transmembranregion und intrazelluläre Domäne aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz des Peptides die Pro-Sequenz umfaßt, mindestens eine der anderen Domänen des Prä-proCadherins fehlt und daß das Peptid zellproliferative, zellprotektive und/oder zelldifferenzierende Eigenschaften aufweist.

Die zellproliferative Wirkung läßt sich beispielsweise an primären Osteoblasten aus Rattencalvarien, die zellprotektiven und/oder zelldifferenzierenden Wirkungen an primären Nervenzellkulturen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen bestimmen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der CDGF ein Fragment des Pro-Cadherins, d.h. des um die Signalsequenz verkürzten Prä-Pro-Cadherins.

Besonders bevorzugt handelt es sich um den N-Terminus des Pro-Cadherins, also den Teil der bei der Prozessierung des Pro-Cadherins zum Cadherin abgespalten wird, bzw. um ein N- oder C-terminal verkürztes Fragment davon.

Vorzugsweise weist der CDGF keinen Cadherin repeat auf.

Erfindungsgemäß bevorzugte Ausführungsformen sind Peptide mit der Sequenz

Cadherin-1 human (28-154):

CHPGFDAESYTFTVVERRHLERGRVLGRVNFCTGRQRTAYFSLDTRFKVGTGCVITVKR-
FLRFHNPQIHFLVYAWDSTYRKFKSTKVTLNGHHHRPPPHQASVSGIQAEELLTFPNSSF-
GLRFQKR

Cadherin-2 human (24-159):

EASGEIALCKTGFPEDVYSAVLISKDVHEGQPLLNVFSNCGKRKVQYESSEPADFKVD-
EDGMVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQEKWQKLSLKPTLTEESVKESAEEVEEIVF-
PFQFSKHSGHLQRQKR

Cadherin-3 human (27-107):

CRAVFREA EVTLEAGGAEQEPGQALGKVFMGQEPALFSTDND DFTVRNGETVQER-
RSLKERNFLKIFPSKRILRRHKR

Cadherin-4 human (21-169):

HNEDLT TRETCKAGFSEDDYTALISQNI LEGEKLQVKSSCVGTKGTQYETNSMDFKG-
ADSTVFATRELQVPSEQVAFTVTAWDSQTAEKWD AVLVAQTSSPHSGHKPQKGKKVVA-
LDPSPPPKDTLLPWPQHQNANGLRRRKR

Cadherin-5 human (26-47):

AGANPAQFDTHSLLPTHERQKR

Cadherin-6 human (19-53):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRSKR

Cadherin-6 human (19-51):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRS

Cadherin-8 human:

MLLDLWTPLIILWITLPPCIYMAPMNQSQVLMSGSPLELNSLGEEQRILNRSKR

Cadherin-B human (Cadherin-11) Precursor (23-53):

FAPERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRSKR

Cadherin-B human (Cadherin-11) Precursor (26-51):

ERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS (OB-CDGF)

Cadherin-C human (Cadherin-12)-Brain-Cadherin Precursor (24-54):

QPQPQQTLATEPRENVIHLPQQRSHFQRVKR

Cadherin-C human (Cadherin-12)-Brain-Cadherin Precursor (24-52):

QPQPQQTLATEPRENVIHLPQQRSHFQRV

Cadherin-D human (Cadherin 13) (23-138):

EDLDCTPGFQQKVFHINQPAEFIEDQSILNLTFSDCKGNDKLRYEVSPPYFKVNSDGG-
LVALRNITAVGKTLFVHARTPHAEFDMAELVIVGGKDISLQDIFKFARTSPVPRQKR-
SVLLLSLFSLACL

Cadherin-F human (Cadherin 14) (22-60):

VPGWRRPTTLYPWRRAPALSRVRRRAWVIPPISVSENHKR.

Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Protein ein aus dem Menschen erhältliches Protein oder eine natürlich vorkommende humane Variante davon.

Ein Gegenstand der Erfindung ist auch ein neues Protein, das Teile der Aminosäuresequenz von CDGF umfaßt. Die Erfindung betrifft vorzugsweise einen CDGF, welcher die oben dargestellten Aminosäuresequenzen enthält, er kann jedoch auch Varianten dieser Sequenzen enthalten. Unter dem Begriff "Varianten" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Sequenzen zu verstehen, die durch Substitution, Deletion und/oder Insertion einzelner Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte sich von den oben dargestellten Aminosäuresequenzen der CDGF unterscheiden.

Unter dem Begriff "Varianten" fallen sowohl natürlich vorkommende allelische Variationen der CDGF sowie durch rekombinante DNA-Technologie (insbesondere durch in vitro-Mutagenese mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden) erzeugte ~~Proteine, die hinsichtlich ihrer biologischen und/oder immunologischen Aktivität den CDGF entsprechen.~~

Konservative Austausche sind beispielsweise Y für/gegen V, K für/gegen S, A für/gegen S, D für/gegen E, G für/gegen S, R für/gegen Q, R für/gegen A, Q für/gegen K.

Erfindungsgemäß beansprucht werden auch Nukleinsäuren, die für die Peptide oder Derivate codieren oder komplementär zu diesen Nukleinsäuren sind. Bei den Nukleinsäuren kann es sich beispielsweise um DNA, RNA, PNA oder nuclease-resistente Analoga handeln. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eignen sich zur Expression der CDGF in vivo im Sinne einer Gentherapie sowie als Antisensenukleotide zur Verringerung der Expression. Auch Vektoren, die die Nukleinsäuren enthalten sind Gegenstand der Erfindung. Die Vektoren eignen sich insbesondere zur Expression des Peptides in gentechnisch veränderten Organismen.

Desweiteren betrifft die Erfindung Antikörper, die gegen CDGF oder Derivate davon gerichtet sind sowie Antagonisten/Inhibitoren, die gegen CDGF, ein Derivat oder eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gerichtet sind. Diese Substanzen eignen sich als Arzneimittel zur Behandlung von Zuständen, die mit einer Überexpression der CDGF verbunden sind sowie zum Einsatz in der Diagnostik.

Die erfindungsgemäßen CDGF, Derivate, Verbindungen, Nukleinsäuren, Antikörper und/ oder Antagonisten/Inhibitoren zusammen mit üblichen Hilfsmitteln können als Arzneimittel verwendet werden. Es wird besonders bevorzugt, daß die Arzneimittel in geeigneten galenischen Zubereitungen zur oralen, bukalen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, intrathekalen,

intranasalen, lokal-topischen Anwendung sowie als Aerosol zur transpulmonalen Applikation vorliegen.

Die Menge an zu verabreichendem Peptid beträgt bevorzugt 1 μ g bis 1 g pro Darreichungseinheit pro Tag.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel eignen sich zur Behandlung und Prophylaxe von degenerativen sowie metabolischen Erkrankungen des Knochens wie Osteoporose, Osteomalazie und Osteopenie, des Pankreas wie Diabetes mellitus, des Muskels wie Muskeldystrophien, der Gefäße, des zentralen und peripheren Nervensystems wie periphere und zentrale Neuropathien, der Lunge wie Asthma bronchiale, des Magens wie Ulcus, sowie zur Therapie und Prophylaxe von entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, sowie zur Wund- und Knochenheilung.

Das erfindungsgemäße Diagnostikmittel enthält poly- oder monoklonale Antikörper gegen das erfindungsgemäße Peptid, gegebenenfalls in markierter Form, wie in fluoreszenz- oder radioaktivmarkierter Form, um in einem an sich bekannten ELISA oder RIA eingesetzt zu werden. Das erfindungsgemäße Diagnostikmittel enthält DNA, RNA und/oder PNA gegebenenfalls in modifizierter und/oder markierter Form zum Einsatz in dem Fachmann bekannten Testsystemen wie PCR oder Fingerprinting.

Die Diagnostikmittel eignen sich zur Kontrolle von CDGF-Spiegeln in Geweben, in Sekreten und/oder in Körperflüssigkeiten wie Plasma, Urin und Liquor cerebrospinalis sowie als Marker für Funktionsstörungen des Knochens, der Muskeln, der Gefäße, des Nervensystems, der Lymphorgane, des Magen-Darmtraktes, des Immunsystems und von Diabetes sowie inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Marker bei Krebs (Tumormarker).

Die erfindungsgemäßen CDGF und ihre Derivate sind durch Isolierung erhältlich aus Hämofiltrat durch Kationenaustauscher-

Extraktion mit nachfolgender Elution der adsorbierten Substanzen, eine erneute Kationenaustauscher-Chromatographie des die Peptide enthaltenden Extraktes sowie mehrstufige Umkehrphasen-Chromatographie. Total synthetisch sind die erfindungsgemäßen ~~Peptide oder durch Festphasensynthese im Sinne der Merrifield-Synthese sowie Flüssigphasensynthese nach dem Fachmann an sich~~ bekannten Methoden mit geschützten Aminosäuren und dessen Aufreinigung erhältlich. Auch durch dem Fachmann an sich bekannte Verfahren der heterologen Expression mittels gängiger biotechnologischer Vektoren lassen sich die erfindungsgemäßen Peptide herstellen.

Beispielsweise wurde ein Peptid, das als OB-CDGF bezeichnet wird, mit chromatographischen Methoden aus humanem Hämofiltrat aufgereinigt und mit Hilfe eines Bioassays identifiziert.

Das Peptid besitzt eine Molekularmasse von 3062.8 Da. OB-CDGF ist eine neue Substanz. Bislang wurde über die Analyse einer cDNA eine OB-Cadherin Prä-Pro-Sequenz postuliert. In dieser aus der cDNA abgeleiteten Sequenz findet sich die erfindungsgemäße Peptidsequenz direkt hinter der putativen Signalsequenz (siehe Figur 1).

Die biochemische Charakterisierung des erfindungsgemäßen Peptides erfolgte durch Massenspektrometrie und Sequenzierung des gesamten Peptides. Die Sequenzanalyse des biologisch aktiven Peptides ergab die folgende Aminosäuresequenz für OB-CDGF:

ERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS

Im ESI (Elektrospray Ionisation)-Massenspektrum des OB-CDGF wurde die Molekularmasse (MW) bestimmt mit:

OB-CDGF, MW 3062.8 Da

Das erfindungsgemäße Peptid ist durch ein Reinigungsverfahren ausgehend von humanem Hämofiltrat erhältlich. Dieses Verfahren

gemäß DE 36 33 707, welches die Gewinnung von Eiweißstoffen aus Hämofiltrat offenbart, wurde in einer modifizierten Form durchgeführt.

Hämofiltrat fällt bei der Ultrafiltration des Blutes von Nierenkranken in großen Mengen an. Das humane Hämofiltrat wird gegebenenfalls mit Wasser verdünnt und angesäuert. Der pH-Wert beträgt vorzugsweise 1.5 bis 3.5, insbesondere 2.5 bis 3.0. Danach wird das Hämofiltrat über einen Kationenaustauscher geleitet, beispielsweise einem mit Sulfonsäuregruppen modifizierenden Trägermaterial (Fraktogel SP - 650 (M), Merck, Darmstadt). Die an den Kationenaustauscher gebundenen Peptide werden mit einer relativ hoch konzentrierten Salzlösung eluiert. Die Ionenstärke der Elutionslösung entspricht dabei ungefähr einer 0.5 bis 1 molaren Ammoniumacetatlösung.

Das aufgefangene Eluat wird einer weiteren Kationenaustauscher-Chromatographie unterzogen. Diese Chromatographie ist vorzugsweise eine Stufenelution mit Puffern von ansteigenden pH-Werten.

Die das erfindungsgemäße Peptid enthaltenen Fraktionen werden mittels präparativer Umkehrphasen-Chromatographie und nachfolgender semipräparativer Umkehrphasen-Chromatographie beispielsweise an mit C4 modifizierten Trägermaterialien weitergereinigt. Der Reinigungsgrad wird vorzugsweise mittels analytischer Umkehrphasen-Chromatographie beispielsweise an mit C18 modifizierten Trägermaterialien überprüft.

Die durch die chromatographische Reinigung erhaltene Substanz wurde der Strukturaufklärung zugeführt. Die Bestimmung der Molekülmassen des nativen Peptids erfolgte mittels eines Elektrospray-Massenspektrometers. Die Sequenzanalyse erfolgte über einen Edman-Abbau der Peptide sowie von chemisch modifizierten Derivaten mit einem ABI 473 A Sequenzer.

Die Totalsynthese erfolgte an üblichen Festphasen im Sinne der Merrifield-Synthese. Die Synthesestrategie und der Aufbau des

Peptids und von ihm abgeleiteten Derivaten mit den entsprechend geschützten Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt.

Das erfindungsgemäße OB-CDGF sowie seine cDNA, sein Gen und ~~Analoga, Fragmente und Derivate zu dem Peptid, der cDNA und dem~~ Gen sowie Antikörper, welche die Wirkung des OB-CDGF aufheben, können als Arzneimittel Verwendung finden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Hämofiltrat-Batch-Extraktion

800 bis 1.000 L Hämofiltrat werden mit HCl auf einen pH -Wert von 2.7 eingestellt und mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 5.5 mS/cm verdünnt und mit einer Flußrate von 3 L/min auf einen starken Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	Vantage VA 250 (Amicon, Witten)
Säulenmaterial:	Fractogel TSK SP 650 (M) , 25 cm x 20 cm
Fluß:	3 L/min
Detektion:	280 nm, pH, Leitfähigkeit
Puffer A:	Hämofiltrat pH 2.7, Leitfähigkeit 5.5 mS/cm
Puffer B:	0.5 M Ammoniumacetat
Anlage:	Autopilot Chromatographiesystem, (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)

Nach Auftrag der insgesamt 1.000 L Flüssigkeit über Nacht wird mit mehreren Säulenvolumina 5 mM HCl gespült. Die Elution der gebundenen Peptide erfolgt als Batch-Elution mit 0.5 M Ammoniumacetat. Hierbei wird eine komplette Elution der Peptide über steigenden pH-Wert (6.8 - 7.2) und steigende Leitfähigkeit (5.5 mS/cm) in etwa 5 L Eluat erreicht.

Erste präparative Auftrennung

Die Ammoniumacetat-Eluate der Batch-Extraktion werden in Mengen von 5.000 bis 10.000 L Hämofiltrat-Peptid vereinigt. Nach pH-Einstellung auf pH 2.7 wird der Peptidextrakt unter Zumischung von VE-Wasser mit einer Leitfähigkeit von 5.5 mS/cm auf den präparativen Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule: Vantage 250 VA
Säulenmaterial: Fractogel TSK SP 650 (M) , 25 cm x 20 cm
Fluß: bis zu 3 L/min während des Auftrages
0.5 bis 1 L während der Elution
Detektion: 280 nm, pH, Leitfähigkeit
Probe: Hämofiltrat pH 2.7, Leitfähigkeit 5.5 mS/cm
Anlage: Autopilot Chromatographiesystem,
(PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)

Nach Auftrag des Rohextraktes über 240 min wird die Säule mit 0.01 M HCl gespült, bis die Leitfähigkeit unter 1 mS/cm ist. Die Elution erfolgt dabei in mehreren Stufen mit den im folgenden angegebenen Puffern

<u>Puffer</u>	<u>pH-Wert</u>	<u>Puffersubstanzen</u>	<u>Leitfähigkeit (mS/cm)</u>
Waschpuffer:	2.0	0.01 M HCl	1
Elutionspuffer 1:	3.6	0.1 M Zitronensäure- 1-hydrat	2.9
Elutionspuffer 2:	4.5	0.1 M Essigsäure + 0.1 M Natriumacetat	4.0
Elutionspuffer 3:	5.0	0.1 M Äpfelsäure	5.2
Elutionspuffer 4:	5.6	0.1 M Bernsteinsäure	5.1
Elutionspuffer 5:	6.6	0.1 M NaH ₂ PO ₄	4.9
Elutionspuffer 6:	7.4	0.1 M NaH ₂ PO ₄	6.7
Elutionspuffer 7:	9.0	0.1 M Ammoniumcarbonat	6.7

Die Eluate 1-7 werden als pH-Pool I-VII bezeichnet. Sie werden separat gesammelt. Die Elution erfolgt bis zum Erreichen einer

neuen Basislinie, wobei für die einzelnen pH-Pools I bis VII Elutionsvolumina von 10 bis 25 L erreicht werden.

Zweite präparative Auftrennung:

Die einzelnen pH-Pools werden zur Fraktionierung und gleichzeitigen Entsalzung über eine Reversed Phase Chromatographie getrennt

Chromatographiebedingungen:

Säule: FineLine 100 (Pharmacia, Freiburg)
Säulenmaterial: Source RPC, 15 μ m 10 x 12.5 cm (FineLine 100)
Fluß: 150 mL/min (FineLine 100)
Detektion: 280 nm, Leitfähigkeit, pH
Puffer A: 10 mM HCl
Puffer B: 80% Acetonitril in 10 mM HCl
Gradient: 0-60% Puffer B in 5 Säulenvolumen

Nach Auftrag der pH-Pools wird die Säule mit Puffer A gespült. Während der Elution werden Fraktionen zu 200 ml gesammelt. Aliquots der Fraktionen werden im Bioassay getestet. Die Fraktionen werden gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert.

Semipräparative Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Die im Bioassay aktive Fraktion 13 aus pH-Pool VI wurde über eine semipräparative Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Die Fraktionen 5-7 enthielten die erfindungsgemäße Substanz.

Chromatographiebedingungen:

Säule: 4,7 cm x 30 cm Stahlsäule
Füllmaterial: Vydac RP-C18 15-20 μ m, 300 Å
Puffer A: 0,1 % TFA
Puffer B: 0,1 % TFA, 80 % Acetonitril
Gradient: 5 - 50% B in 45 min, 50 - 100% B in 10 min

Fluß: 42 ml/min

Detektion: 214 nm und 280 nm

Chromatographieanlage: BioCad

Fraktionen: á 1.5 min ab Start des Gradienten

Massenbestimmungen

Alle Massenbestimmungen der nativen und synthetischen Peptide wurden auf einem Elektrospray-Massenspektrometer (ESI-MS) durchgeführt. Die Molekülmassen des Peptids wurden entsprechend der oben gezeigten Massenzahlen (MW) bestimmt.

Sequenzbestimmung

Das gereinigte, native und das synthetisch hergestellte Peptid wurde mittels Edman-Abbau auf einem ABI 473 A Sequenzer unter Verwendung des Standard-Programms analysiert. Die Proben werden auf eine Polybrene-Membran in Mengen zwischen 100 und 400 pmol aufgetragen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Massenbestimmungen ergab sich folgende Aminosäuresequenz:

ERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS

Datenbankvergleich

Ein Datenbankvergleich wurde mit Hilfe des HUSAR-Programmpakets an den SwissProt und EMBL-Nukleinsäure Datenbanken durchgeführt. Die Sequenz entspricht den aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuren des humanen Cadherin-11 Precursors (Osteoblasten Cadherin, Propeptid, Aminosäuren 26-51).

Resynthese

Die Synthese des Peptids mit der Sequenz ERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS wurde nach der Merrifield-Festphasen-Methode ausgehend von geschützten Fmoc-Aminosäuren durchgeführt. Das synthetische Peptid wurde über Umkehrphasen-Chromatographie aufgereinigt.

Die Identität und Reinheit der Substanz wurde mit Hilfe von Massenspektrometrie, Sequenzanalyse und Kapillarzonenelktrophorese nachgewiesen.

Bestimmung der biologischen Aktivität von OB-CDGF (zellproliferativer Effekt)

Die Isolierung des OB-CDGF erfolgte anhand seiner biologischen Aktivität in einem Proliferationssassay der primären Osteoblasten. Dazu wurden jeweils Aliquots der unter Beispiel 1 beschriebenen einzelnen Chromatographiestufen gefriergetrocknet und anschließend dem biologischen Assay zugeführt. Die Fraktionen, die jeweils ein positives Signal ergaben, wurden der weiteren Reinigung unterzogen.

Der Assay mißt die Proliferation der Zellen, nachdem sie in serumfreien Medium mit 1 mg/ml Rinderserumalbumin gehalten wurden, dann die Proben zugegeben wurden und nach weiteren 48 Stunden der Einbau von 3H-Thymidin bestimmt wurde. Als Positivkontrolle wird in diesem Assay knochenwachstumsfördernde Faktoren wie IGF oder Angiotensin oder fötales Kälberserum (FCS) eingesetzt.

Die Experimente wurden in Anlehnung an Pfeilschifter et al., Endocrinology 126, 703, 1990, durchgeführt.

Die Gewinnung von primären Osteoblasten erfolgte durch sequentielle Abkautung mittels Collagenase aus fetalen Rattenkalvarien. Dabei wurden 5 Zellfraktionen erhalten. Der Pool aus den Zellfraktionen 3-5 wurde in vitro kultiviert. Die Kultur der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei einer relativen Luftfeuchte von 95%, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Temperatur von 37°C. Die Untersuchungen der Prüfsbstanzcn erfolgte in Kulturen der ersten, zweiten oder dritten Zellpassage.

Für die Untersuchung wurden die Zellen mindestens 95 Stunden vor Aufgabe der Prüfsubstanzen in einer Zellzahl von 7×10^3 Zellen (in 100 μ l Kulturmedium) / Well in Mikrotiterplatten (MTP) mit Rundboden ausgesät. Dabei fand als Kulturmedium MEM Dulbecco (plus 4,5 g/l Glukose plus 3,7 g/l NaHCO_3 ohne Glutamin) Verwendung, dem 5% fetales Kälberserum (FKS) und 5000 U/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt werden.

Unmittelbar vor Zugabe der Prüfsubstanzen zur Zellkultur erfolgte ein Austausch des Mediums gegen 150 μ l Medium, das anstelle von FKS 1 mg/ml Rinderserumalbumin (RSA) enthielt. Prüfsubstanzen wurden in den gewünschten Konzentrationen dem RSA-haltigen Medium zugesetzt. Als Positivkontrolle wurde $\text{TGF}\beta_1$ (Transforming growth factor β_1) in Konzentrationen von 0,1-0,2 ng/ml mitgeführt. Pro (Positiv-) Kontrolle bzw. Substanzkonzentration wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Inkubation der Zellkulturen mit Prüfsubstanzen erfolgte 24 bis 72 Stunden, in den letzten 3 Stunden zusätzlich unter Anwesenheit der Thymidinsonde (Zugabe von 1 μ Ci Methyl- ^3H -Thymidin/MTP-Vertiefung in 20 μ l PBS-Lösung).

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellkulturen 3x mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen und anschließend mit je 100 μ l Flüssigszintillator (OptiPhase Supermix™ der Firma Wallac) versetzt. Im Anschluß daran erfolgte die Vermessung der in die DNA eingebauten Radioaktivität in einem Flüssigszintillationscounter (1450 MicroBeta™ der Firma Wallac) in cpm.

Bei der Auswertung dienen Zellkulturen, die ausschließlich RSA-haltiges Medium erhalten hatten, als Kontrollen (100%).

Der OB-CDGF besitzt in dosisabhängiger Weise eine wachstumsfördernde Wirkung auf primäre Osteoblasten (Knochenzellen). Diese biologische Wirkung wurde sowohl für das native als auch für das synthetisch hergestellte Peptid nachgewiesen.

Beispiel 2

Bestimmung der biologischen Aktivität BR-CDGF

~~Das der CDGF-Region des Cadherin-12 (BR-Cadherin; N-Cadherin-2)~~
~~entsprechende Peptid mit der Aminosäuresequenz QPQPQQTLLATEPREN-~~
VIHLPGQRSHFQRV, welches nach der Festphasensynthese - wie unter
Beispiel 1 für das OB-CDGF beschrieben - synthetisiert wurde,
wurde auf seine Überlebensfördernde Wirkung auf Primärkulturen
von Neuronen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen
getestet.

Das Testmodell ist folgendermaßen aufgebaut:

Primäre Nervenzellkulturen aus Hinterwurzelganglien von Hüh-
nerembryonen (Embryonalentwicklung E10)

Die Präparation und Kultivierung erfolgt wie beschrieben von
Borasio G.D., John J., Wittinghofer A., Barde Y.-A., Sendtner
M. Heumann R. (1989) Neuron 2, 1087-1096. Zur Bestimmung von
Überlebensfördernden Effekten von Wirkstoffen wird die Bestim-
mung des zellulären LDH-Gehalts nach einer Inkubationszeit von
48 Stunden eingesetzt. Hierzu wird das Kulturmedium durch
Ausklopfen der Platte entfernt. Nur die vitalen Zellen bleiben
am Plattenboden haften und können dann bestimmt werden. Zur
Bestimmung des LDH-Gehalts wird der LDH-Zytotoxizitätstestkit
von Boehringer Mannheim (BM) eingesetzt.

Die Kulturen werden in 96-Well Mikrotiterplatten als Duplikate
eingesetzt. Auf jeder Platte wird eine NGF-Eichkurve mitgeführt
und die biologische Aktivität der Substanzen in pg/mL NGF-
Äquivalenten ausgedrückt. Als niedermolekulare Referenzsubstanz
wird das Staurosporin-Derivat K252a in einer Konzentration von
300 nmol/L mitgeführt.

Das Peptid zeigte in konzentrationsabhängiger Weise eine Über-
lebensfördernde Wirkung auf diese primären Neuronen. Diese

Zellen sind typische Nervenzellen, so daß BR-CDGF ein neuroprotektiver Faktor ist.

Beispiel 3

Bestimmung der biologischen Aktivität CAD6-CDGF (zellprotektiver Effekt)

Das der CDGF-Region des Cadherin-6 entsprechende Peptid mit der Aminosäuresequenz TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRS, welches nach der Festphasensynthese - wie unter Beispiel 1 für das OB-CDGF beschrieben - synthetisiert wurde, wurde auf seine überlebensfördernde Wirkung auf Primärkulturen von Neuronen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen getestet. Das Testmodell ist, wie in Beispiel 2 beschrieben, aufgebaut.

Das Peptid zeigte in konzentrationsabhängiger Weise eine überlebensfördernde Wirkung auf diese primären Neuronen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Wolf-Georg Forssmann

(B) STRASSE: Feodor-Lynen-Strasse 31

(C) ORT: Hannover

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 30625

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Cadherin derived growth factor
und seine Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 14

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: Patent In Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 123 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Cys	His	Pro	Gly	Phe	Asp	Ala	Glu	Ser	Tyr	Thr	Phe	Thr	Val	Pro	Arg	
1				5					10					15		
Arg	His	Leu	Glu	Arg	Gly	Arg	Val	Leu	Gly	Arg	Val	Asn	Phe	Cys	Thr	
			20					25					30			
Gly	Arg	Gln	Arg	Thr	Ala	Tyr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Arg	Phe	Lys	Val	
			35				40					45				
Gly	Thr	Asp	Gly	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Arg	Pro	Leu	Arg	Phe	His	Asn	
			50			55				60						
Pro	Gln	Ile	His	Phe	Leu	Val	Tyr	Ala	Trp	Asp	Ser	Thr	Tyr	Arg	Lys	
65					70				75					80		
Phe	Ser	Thr	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Gly	His	His	His	Arg	Pro	Pro	Pro	
			85					90						95		

His Gln Ala Ser Val Ser Gly Ile Gln Ala Glu Leu Leu Thr Phe Pro
 100 105 110
 Asn Ser Ser Pro Gly Leu Arg Arg Gln Lys Arg
 115 120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 132 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Glu Ala Ser Gly Glu Ile Ala Leu Cys Lys Thr Gly Phe Pro Glu Asp
 1 5 10 15
 Val Tyr Ser Ala Val Leu Ser Lys Asp Val His Glu Gly Gln Pro Leu
 20 25 30
 Leu Asn Val Phe Ser Asn Cys Asn Gly Lys Arg Lys Val Gln Tyr Glu
 35 40 45
 Ser Ser Glu Pro Ala Asp Phe Lys Val Asp Glu Asp Gly Met Val Tyr
 50 55 60
 Ala Val Arg Ser Phe Pro Leu Ser Ser Glu His Ala Lys Phe Leu Ile
 65 70 75 80
 Tyr Ala Gln Asp Lys Glu Thr Gln Glu Lys Trp Gln Lys Leu Ser Leu
 85 90 95
 Lys Pro Thr Leu Thr Glu Glu Ser Val Lys Glu Ser Ala Glu Val Glu
 100 105 110
 Glu Ile Val Phe Pro Arg Gln Phe Ser Lys His Ser Gly His Leu Gln
 115 120 125
 Arg Gln Lys Arg
 130

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 78 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Cys	Arg	Ala	Val	Phe	Arg	Glu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Glu	Ala	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ala	Glu	Gln	Glu	Pro	Gly	Gln	Ala	Leu	Gly	Lys	Val	Phe	Met	Gly	Gln
		20						25					30		
Glu	Pro	Ala	Leu	Phe	Ser	Thr	Asp	Asn	Asp	Asp	Phe	Thr	Val	Arg	Asn
		35					40					45			
Gly	Glu	Thr	Val	Gln	Glu	Arg	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Arg	Asn	Pro	Leu
	50					55					60				
Lys	Ile	Phe	Pro	Ser	Lys	Arg	Ile	Leu	Arg	Arg	His	Lys	Arg		
65					70					75					

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 144 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

His	Asn	Glu	Asp	Leu	Thr	Thr	Arg	Glu	Thr	Cys	Lys	Ala	Gly	Phe	Ser
1				5					10					15	
Glu	Asp	Asp	Tyr	Thr	Ala	Leu	Ile	Ser	Gln	Asn	Ile	Leu	Glu	Gly	Glu
		20						25					30		
Lys	Leu	Leu	Gln	Val	Lys	Ser	Ser	Cys	Val	Gly	Thr	Lys	Gly	Thr	Gln
		35					40					45			
Tyr	Glu	Thr	Asn	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Gly	Ala	Asp	Gly	Thr	Val	Phe
	50					55					60				
Ala	Thr	Arg	Glu	Leu	Gln	Val	Pro	Ser	Glu	Gln	Val	Ala	Phe	Thr	Val
65				70					75					80	
Thr	Ala	Trp	Asp	Ser	Gln	Thr	Ala	Glu	Lys	Trp	Asp	Ala	Val	Leu	Val
		85						90					95		
Ala	Gln	Thr	Ser	Ser	Pro	His	Ser	Gly	His	Lys	Pro	Gln	Lys	Gly	Lys
		100						105					110		
Lys	Val	Val	Ala	Leu	Asp	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Leu
	115						120				125				
Pro	Trp	Pro	Gln	His	Gln	Asn	Ala	Asn	Gly	Leu	Arg	Arg	Arg	Lys	Arg
	130					135					140				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ~~ART DES MOLEKÜLS: Peptid~~

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Ala Gly Ala Asn Pro Ala Gln Arg Asp Thr His Ser Leu Leu Pro Thr
1 5 10 15
His Arg Arg Gln Lys Arg
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

[illegible]

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Thr Leu Ser Thr Pro Leu Ser Lys Arg Thr Ser Gly Phe Pro Ala Lys
1 5 10 15

Lys Arg Ala Leu Glu Leu Ser Gly Asn Ser Lys Asn Glu Leu Asn Arg
20 25 30
Ser

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 54 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Leu Leu Asp Leu Trp Thr Pro Leu Ile Ile Leu Trp Ile Thr Leu
1 5 10 15
Pro Pro Cys Ile Tyr Met Ala Pro Met Asn Gln Ser Gln Val Leu Met
20 25 30
Ser Gly Ser Pro Leu Glu Leu Asn Ser Leu Gly Glu Glu Gln Arg Ile
35 40 45
Leu Asn Arg Ser Lys Arg
50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Phe Ala Pro Glu Arg Arg Gly His Leu Arg Pro Ser Phe His Gly His
1 5 10 15
His Glu Lys Gly Lys Glu Gly Gln Val Leu Gln Arg Ser Lys Arg
20 25 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- A) LÄNGE: 26 Aminosäuren
B) ART: Aminosäure
C) STRANGFORM: nicht bekannt

- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Glu	Arg	Arg	Gly	His	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	His	Gly	His	His	Glu	Lys
1			5					10						15	
<hr/>															
Gly	Lys	Glu	Gly	Gln	Val	Leu	Gln	Arg	Ser						
			20					25							

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Gln	Pro	Gln	Pro	Gln	Gln	Thr	Leu	Ala	Thr	Glu	Pro	Arg	Glu	Asn	Val
1			5						10					15	
Ile	His	Leu	Pro	Gly	Gln	Arg	Ser	His	Phe	Gln	Arg	Val	Lys	Arg	
			20				25						30		

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Gln	Pro	Gln	Pro	Gln	Gln	Thr	Leu	Ala	Thr	Glu	Pro	Arg	Glu	Asn	Val
1			5						10					15	
Ile	His	Leu	Pro	Gly	Gln	Arg	Ser	His	Phe	Gln	Arg	Val			
			20				25								

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 129 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

[illegible]

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 39 Aminosäuren

(B) AFT: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

```

Val Pro Gly Trp Arg Arg Pro Thr Thr Leu Tyr Pro Trp Arg Arg Ala
1          5          10          15
Pro Ala Leu Ser Arg Val Arg Arg Ala Trp Val Ile Pro Pro Ile Ser
          20          25          30
Val Ser Glu Asn His Lys Arg
          35

```

Patentansprüche

1. Als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnetes Peptid, dessen Sequenz einer Teilsequenz eines Prä-Pro-Cadherins entspricht, wobei das Präpro-Cadherin die Domänen Signalsequenz, Pro-Sequenz, Cadherin repeats, Transmembranregion und intrazelluläre Domäne aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz des Peptides die Pro-Sequenz umfaßt, mindestens eine der anderen Domänen des Präpro-Cadherins fehlt und daß das Peptid zellproliferative, zellprotektive und/oder zelldifferenzierende Eigenschaften aufweist.
2. CDGF gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das CDGF zellproliferativ auf primäre Osteoblasten aus Ratten-calvarien wirkt.
3. CDGF gemäß Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das CDGF zellprotektiv und/oder zelldifferenzierend auf primäre Nervenzellkulturen aus Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen wirkt.
4. CDGF gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der CDGF ein Fragment des Pro-Cadherins ist.
5. CDGF gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um das Peptid handelt, das bei der Prozessierung von Pro-Cadherin zu Cadherin abgespalten wird oder um ein Fragment davon handelt.
6. CDGF gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der CDGF keinen Cadherin repeat aufweist.

7. CDGF mit der Sequenz

Cadherin-1 human (28-154):

CHPGFDAESYTFTVPRRHLEGRVLGRVNFCTGRQRTAYFSLETRFKVGTGCVIT-
VVRPLRFHNPQIHFLVYAWDSTYRKESTKVTLNGHHHRPPPHQASVSGIQAEELLTFP-
NSSPGLRRQKR

Cadherin-2 human (24-159):

EASGEIALCYTGFPEDVYSAVLSKDVHEGQPLLNVFSNCNGKRKVVQYESSEPADF-
KVDDEGMVYAVRSFPLSSEHAKFLIYAQDKETQEKWQKLSLKFTLTEESVKESAEVE-
EIVFFRQFSKHSGLQRQKR

Cadherin-3 human (27-107):

CPAVFREAEVTLLEAGGAEQEPGQALGKVFMGQEPALFSTDNDQFTVRNGETVQER-
RSLKEFNPLKIFPSKRILRRHKR

Cadherin-4 human (21-169):

HNEDLTTRETCKAGFSEDDYTALISQNILEGKLLQVKSSCVGTGKTQYETNSMD-
FKGADGTVFATRELQVPSEQVAFTVTAWDSQTAEKWDAVLVAQTSSPHSGHKPQKKGK-
KVVALDFSPPPKDTLLPWPQHQNANGLRRRKR

Cadherin-5 human (26-47):

AGANPAQRDTHSLLPTHRRQKR

Cadherin-6 human (19-53):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSFNELNRSKR

Cadherin-6 human (19-51):

TLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRS

Cadherin-8 human:

KLLDLWTPLIILWITLPPDIYMAPMNQSQVLMMSGSPLELNSLGEEQRILNRSKR

Cadherin-3 human (Cadherin-11) Precursor (23-53):

FAPERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRSKR

ERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRS (OB-CDGF)

Cadherin-C human (Cadherin-12) - Brain-Cadherin Precursor
(24-54):

QPQPQQTLATEPRENVIHLPGQRSHFQVRKR

Cadherin-C human (Cadherin-12) - Brain-Cadherin Precursor
(24-52):

QPQPQQTLATEPRENVIHLPGQRSHFQVRV

Cadherin-D human (Cadherin 13) (23-138):

EDLDCTPGFQQKVFHINQPAEFIEDQSILNLTFSDCKGNDKLRYEVSSPYFKVNS-
DGGLVALRNITAVGKTLFVHARTPHAEFDMAELVIVGGKDISLQDIFKFARTSPVPR-
QKRPSVLLLSLFLACL

Cadherin-F human (Cadherin 14) (22-60):

VPGWRRPTTLYPWRRAPALSRVRRRAWVIPPISVSENHKR

8. Varianten von CDGF, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um allelische Variationen der CDGF oder um durch in-vitro Mutagenese erhältliche Peptide handelt, die in ihrer biologischen und/oder immunologischen Aktivität den CDGF entsprechen.
9. Verbindung dadurch gekennzeichnet, daß sie CDGF oder Derivate gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 enthalten und zellproliferative, zellprotektive und/oder zelldifferenzierende Eigenschaften aufweisen.
10. Nukleinsäuren codierend für Peptide oder Derivate gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8.
11. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zur Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 ist.
12. Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um DNA, RNA, PNA oder nuclease-resistente Analoga davon handelt.

13. Vektoren enthaltend Nukleinsäuren gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12.
14. Antikörper dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen CDGF oder ein Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 gerichtet sind.
15. Antagonist/Inhibitor dadurch gekennzeichnet, daß er gerichtet ist gegen CDGF oder ein Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 oder gegen eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12.
16. Arzneimittel enthaltend CDGF oder Derivate gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, Verbindungen gemäß Anspruch 9, Nukleinsäuren gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12, Antikörper gemäß Anspruch 14 und/oder Antagonisten/Inhibitoren gemäß Anspruch 15 zusammen mit üblichen Hilfsmitteln.
17. Diagnostikmittel enthaltend CDGF oder Derivate gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, Verbindung gemäß Anspruch 9, Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12, Antikörper gemäß Anspruch 14 und/oder Antagonisten/Inhibitoren gemäß Anspruch 15 zusammen mit üblichen Hilfsmitteln.
18. Arzneimittel gemäß Anspruch 16 in geeigneten galenischen Zubereitungen zur oralen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, intrathekalen Anwendung sowie als Aerosol zur transpulmonalen Applikation.
19. Verwendung der Arzneimittel gemäß Anspruch 16 zur Behandlung und Prophylaxe von degenerativen sowie metabolischen Erkrankungen des Knochens wie Osteoporose, Osteomalazie und Osteopenie, des Pankreas wie Diabetes mellitus, des Muskels wie Muskeldystrophien, der Gefäße, des zentralen und peripheren Nervensystems wie periphere und zentrale Neuropathien, der Lunge wie Asthma bronchiale, des Magens

wie Ulcus, sowie zur Therapie und Prophylaxe von entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, sowie zur Wund- und Knochenheilung.

-
20. Verwendung des Diagnostikmittels zur Kontrolle von CDGF-Spiegeln in Geweben, in Sekreten und/oder in Körperflüssigkeiten wie Plasma, Urin und Liquor cerebrospinalis.
-
21. Verwendung des Diagnostikmittels gemäß Anspruch 17 als Marker für Funktionsstörungen des Knochens, der Muskeln, der Gefäße, des Nervensystems, der Lymphorgane, des Magen-Darmtraktes, des Immunsystems und von Diabetes sowie inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Tumormarker.
22. Verfahren zur Herstellung von CDGF oder Derivaten nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8 aus Hämofiltrat durch Kationenaustauscher-Extraktion mit nachfolgender Elution der adsorbierten Substanzen, eine erneute Kationenaustauscher-Chromatographie des die Peptide enthaltenden Extraktes sowie mehrstufige Umkehrphasen-Chromatographie oder durch Festphasensynthese im Sinne der Merrifield-Synthese sowie Flüssigphasensynthese nach dem Fachmann an sich bekannten Methoden mit geschützten Aminosäuren und dessen Aufreinigung oder durch dem Fachmann an sich bekannte Verfahren der heterologen Expression mittels gängiger biotechnologischer Vektoren.

Zusammenfassung

Als Cadherin Derived Growth Factor (CDGF) bezeichnetes Peptid, dessen Sequenz einer Teilsequenz eines Prä-Pro-Cadherins entspricht, wobei das Präpro-Cadherin die Domänen Signalsequenz, Pro-Sequenz, Cadherin repeats, Transmembranregion und intrazelluläre Domäne aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz des Peptides die Pro-Sequenz umfaßt, mindestens eine der anderen Domänen des Prä-pro-Cadherins fehlt und daß das Peptid zellproliferative, zellprotektive und/oder zelldifferenzierende Eigenschaften aufweist.



1
2
3